四个达摩凤蝶新孵幼虫细胞系的建立及其生物学特性

丁伟峰，冯　颖[*]，张　欣，李　娴，王成业，谢世聪

（中国林业科学研究院资源昆虫研究所，国家林业局资源昆虫培育与利用重点实验室，昆明 650224）

摘要：【目的】建立达摩凤蝶 *Papilio demoleus* Linnaeus 新孵幼虫细胞系，并对其生物学特性进行研究。【方法】使用改良配方的 Grace 培养基并辅以 20% 胎牛血清，通过原代和传代培养建立达摩凤蝶新孵幼虫细胞系。通过显微观察、细胞活力分析、核型分析和分子鉴定，获得 4 个新建细胞系的生物学特性数据。使用 Bac-To-Bac® 杆状病毒表达系统构建重组分泌型碱性磷酸酶杆状病毒（AcMNPV-SEAP）。使用有限稀释法测定达摩凤蝶细胞系对 AcMNPV-SEAP 的半数组织培养感染剂量（$TCID_{50}$），比较达摩凤蝶细胞系对 AcMNPV-SEAP 的敏感性。【结果】建立了 4 个贴壁生长的达摩凤蝶新孵幼虫细胞系（RIRI-PaDe-1，RIRI-PaDe-2，RIRI-PaDe-3 及 RIRI-PaDe-4），且均传至60代以上。形态学方面，细胞系 RIRI-PaDe-1 和 RIRI-PaDe-4 较为相近，均由圆形、梭形以及多边形细胞组成，细胞系 RIRI-PaDe-2 主要为圆形细胞，而 RIRI-PaDe-3 主要为类似表皮细胞和纤维状细胞。细胞增殖动力学方面，4 个细胞系的群体倍增时间分别为 69.77，67.42，81.48 及 65.43 h。核型分析显示 4 个细胞系染色体数量均呈正态分布，其中 RIRI-PaDe-2，RIRI-PaDe-3 以及 RIRI-PaDe-4 的染色体数目分布区间比较接近，在45~97 条之间，RIRI-PaDe-1 的染色体条数相比偏少，在 36~90 条之间。通过比对 4 个达摩凤蝶细胞系和虫卵的细胞色素 c 氧化酶亚基 I(COI)基因序列，证明 4 个新建细胞系来源于达摩凤蝶组织。比较 4 个细胞系对 AcMNPV-SEAP 敏感性发现 RIRI-PaDe-3 对此病毒较为敏感，可作为重组杆状病毒表达的宿主。【结论】虽然 4 个新建达摩凤蝶细胞系的来源相同，具有相同的遗传背景，但其生物学特征仍有明显差异，具有进一步研究的价值。

关键词：达摩凤蝶；新孵幼虫；昆虫细胞系；分泌型碱性磷酸酶；重组杆状病毒

中图分类号：Q965.8　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**0454-6296(2015)08-0826-10

Establishment and characterization of four cell lines developed from *Papilio demoleus* (Lepidoptera: Papilionidae)

DING Wei-Feng, FENG Ying[*], ZHANG Xin, LI Xian, WANG Cheng-Ye, XIE Shi-Cong (Key Laboratory of Cultivating and Utilization of Resource Insects of State Forestry Administration, Research Institute of Resource Insects, Chinese Academy of Forestry, Kunming 650224, China)

Abstract:【Aim】This study aims to establish and characterize cell lines developed from the neonate larvae of *Papilio demoleus* Linnaeus.【Methods】Modified Grace's medium supplemented with 20% fetal bovine serum was used to culture tissues from neonate larvae of *P. demoleus*. The methods of cell morphology analysis, growth analysis, chromosome analysis, and molecular identification of the cell lines were used to obtain the biological characteristics of new cell lines. In order to study the viral susceptibility of four cell lines derived from *P. demoleus*, recombinant baculovirus carrying secreted alkaline phosphatase (AcMNPV-SEAP) was constructed using Bac-to-Bac® baculovirus expression system to infect the cell lines. The median tissue culture infectious dose ($TCID_{50}$) of each cell line was measured using limiting dilution method by measuring the expression of recombinant SEAP.【Results】Four new cell lines developed from the neonate larvae of *P. demoleus* were established on modified Grace's

基金项目：国家林业局引进国际先进林业科学技术（"948"）项目（2013-4-53）；中央及公益性科研院所基本科研业务费专项资金（riricaf2012003M）

作者简介：丁伟峰，男，1980 年生，新疆乌鲁木齐人，助理研究员，从事昆虫细胞工程相关研究，E-mail：dingweifeng0302@126.com

[*] 通讯作者 Corresponding author，E-mail：rirify@139.com

收稿日期 Received：2015-03-26；接受日期 Accepted：2015-06-19

medium and named RIRI-PaDe-1, RIRI-PaDe-2, RIRI-PaDe-3 and RIRI-PaDe-4, respectively. These cells were subcultured for approximately 60 passages. There were significant differences in biological characteristics between different cell lines. According to morphology, RIRI-PaDe-1 and RIRI-PaDe-4 were composed of round, spindle and polygonal cells, RIRI-PaDe-2 was mainly composed of round cells, and RIRI-PaDe-4 was mainly composed of epidermal-like and fibrous cells. The cell population doubling time (PDT) of IRI-PaDe-1, RIRI-PaDe-2, RIRI-PaDe-3 and RIRI-PaDe-4 was 69.77, 67.42, 81.48 and 65.43 h, respectively. Karyotype analysis showed that the number of chromosome of each cell line fitted the normal distribution. The chromosome numbers of RIRI-PaDe-2, RIRI-PaDe-3 and RIRI-PaDe-4 varied widely from 45 to 97, while that of RIRI-PaDe-1 varied from 36 to 90. All of the four cell lines could be infected with the AcMNPV-SEAP, but RIRI-PaDe-3 was more susceptible to AcMNPV-SEAP. 【Conclusion】Although the four new cell lines developed from the neonate larvae of *P. demoleus* have the same genetic background analyzed by DNA amplification fingerprinting (DAF) using mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, there are still significant differences in the basic biological characteristics among them. It is worthy to be further researched.

Key words: *Papilio demoleus*; neonate larvae; insect cell line; secreted alkaline phosphatase; recombinant baculovirus

昆虫细胞系及其培养技术已被广泛应用于昆虫生理学、昆虫病理学及分子生物学等领域(Lynn, 2002)。其中,利用昆虫细胞作为生物反应器的杆状病毒表达系统(baculovirus expression vector system, BEVS)已被用于重组蛋白的体外表达,在生物学、农业以及医学领域发挥重要作用(Granados *et al*., 2007)。目前,已报道的昆虫细胞系超过 500 个,其中半数以上取材于鳞翅目昆虫,为昆虫杆状病毒研究提供了充足的试验材料(Murhammer, 2007)。但是,大多数建立的细胞系来源集中于少数几个目的昆虫,其中仅有 4 个细胞被广泛用于 BEVS 的构建:来源于鳞翅目夜蛾科草地夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 卵巢细胞系 Sf9 和 Sf21 (Vaughn *et al*., 1977);粉纹夜蛾 *Tricoplusia ni* 细胞系 BTI-Tn-5B1-4(Granados *et al*., 1994),其商品名 High Five™,由 Life Technologies 公司销售;双翅目果蝇科黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 胚细胞系 SL2(Schneider, 1972)。仍有种类繁多的昆虫未能建立稳定传代的无限细胞系(Mitsuhashi, 2001)。建立更多新的昆虫细胞系不仅为筛选和发掘具有特殊功能和生物学特性的细胞系提供可能,也为昆虫生理生化及基础生物学研究提供试验材料,具有重要的意义(Granados *et al*., 2007; 郑桂玲等, 2010)。

虽然目前已建立的鳞翅目昆虫细胞系已有几百个,但来源于凤蝶科(Papilionidae)昆虫细胞系数量不超过 10 个(Murhammer, 2007)。达摩凤蝶 *Papilio demoleus* Linnaeus 的幼虫是芸香科(Rutaceae)和豆科(Fabaceae)植物的重要害虫(Lewis, 2009);但其成虫翅表花纹美丽,是一类具有观赏价值的经济昆虫。本研究以达摩凤蝶 *Papilio demoleus* 新孵幼虫组织作为建系的试验材料,经过长达 7 个月的原代培养期后,细胞进入了传代培养阶段,最终获得了 4 个能稳定传代的细胞系,分别命名为 RIRI-PaDe-1, RIRI-PaDe-2, RIRI-PaDe-3 及 RIRI-PaDe-4。本文将对建系过程、各细胞系生物学特性,以及对重组分泌型碱性磷酸酶核型多角体病毒(AcMNPV-SEAP)侵染力大小进行比较。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

达摩凤蝶 *P. demoleus* 卵采于中国林业科学研究院资源昆虫研究所元江试验站。

1.2 昆虫细胞系的建立

1.2.1 原代培养:将收集的达摩凤蝶卵用 70% 医用酒精进行 5 min 的表面消毒,之后用灭菌的蒸馏水冲洗以便除去残留的乙醇。将消毒后的虫卵分装至35 mm 直径的 Corning® 无菌培养皿(货号 430165),每皿约 10 枚虫卵,培养皿封口后于 28℃ 恒温孵化。当卵孵化后,用灭菌的镊子将新孵幼虫转移至 1.5 mL Eppendorf®离心管中,管内已提前添加 100 μL HyClone® 0.05% 胰蛋白酶消化液(货号 SH30236.01),每管约取 5 条幼虫。用灭菌的小剪刀将幼虫剪碎,室温静置 15 min 进行组织消化。之后,将幼虫组织块连同消化液转移至底面积为 12.5 cm^2 的 BD Falcon®细胞培养瓶(货号 353018),每瓶

添加5 mL培养基，置于 28℃ 避光恒温培养，每 2 周更换一半的培养基。本研究所用培养基以 Grace 培养基为基础进行了改良(Zhang *et al*., 2011, 2012)，并添加 20% 胎牛血清以促进细胞生长，血清为 HyClone® 南美胎牛血清(货号 SV30087.02)与兰州民海生物工程有限公司生产的类标准胎牛血清以 1∶1(v/v)混合后使用。

1.2.2 传代培养：当原代培养的细胞长满培养瓶底后开始进行传代培养。传代操作时用 5 mL 移液器或巴氏吸管轻轻吹起贴壁生长的细胞，然后吸取一半细胞液至新培养瓶，补加培养基后继续培养。等待细胞状态恢复并贴满瓶底后再进行下一次传代操作。

1.3 生物学特性研究

1.3.1 细胞形态学观察：使用 Olympus IX71® 倒置生物显微镜进行观察并拍照，用 Olympus CellSens® 图像分析软件进行细胞大小测量。

1.3.2 细胞生长曲线绘制及倍增时间计算：取 50 代以上的细胞系作为检测样品。取对数生长期的细胞，用培养基稀释细胞使密度降至 2×10^5 个/mL 左右，并将混合好的细胞液均匀分装至 20 个培养瓶，每瓶 5 mL 细胞液于 28℃ 恒温培养箱中继续培养。每隔 24 h 取一瓶细胞进行检测。轻轻吹打贴壁细胞使其全部悬浮，使用 Beckman Vi-CELL® 全自动细胞活力分析仪对细胞活力和密度进行分析测定。以时间作为横坐标，活细胞密度作为纵坐标绘制细胞密度随培养时间变化的生长曲线图，根据曲线走势确定细胞进入指数生长期阶段，并根据参考文献(Mitsuhashi, 2002)所述公式计算细胞倍增时间。

1.3.3 核型分析：取 50 代以上的细胞系作为检测样品，根据 Mitsuhashi(2002)所述方法进行细胞固定制片，其中低渗溶液 KCl 的浓度为 0.6%。使用 Nikon ECLIPSE E800 生物显微镜进行观察并拍照，挑选染色体清晰且分散比较好的细胞样本进行染色体计数(样本数≥100)，根据 Yeh 等(2007)所述方法进行统计分析。

1.3.4 细胞来源鉴定：使用北京全式金生物技术有限公司的 EasyPure™ 基因组 DNA 提取试剂盒(货号 EE101-01)分别提取达摩凤蝶新孵幼虫细胞系、幼虫组织块，以及 High Five 细胞系(作为对照)的总 DNA，并用 PCR 扩增细胞色素 c 氧化酶亚基 I (mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I gene, COI) 基因。引物序列为：HCOI：5′-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3′；LCOI：5′-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3′ (Folmer *et al*., 1994)。PCR 反应条件：94℃ 5 min；35 个循环：94℃ 1 min，54℃ 1 min；72℃ 2 min。产物交由生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序，结果使用 MEGA4.1 软件进行分析(Tamura *et al*., 2007)。

1.4 对 AcMNPV 敏感性检测

取 50 代以上的细胞系作为检测样品。取指数生长期的 4 个达摩凤蝶新孵幼虫细胞系，密度分别稀释至 2.0×10^5 个/mL 后接种于 Corning® 24 孔细胞培养板(货号 3524)中。每个细胞系铺 4 孔，每孔 1 mL，静置 1 h，使细胞全部贴壁。取苜蓿银纹夜蛾核多角体病毒(*Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus, AcMNPV)(江苏大学唐平博士馈赠)储备液(滴度为 1.45×10^8 pfu/mL)分别接种 4 个细胞系，每个细胞接种 2 孔，每孔 200 μL 病毒液，置于 28℃ 培养箱中 2 h。吸弃每孔中的全部培养基，添加新鲜培养基 2 mL/孔，置于 28℃ 避光培养。120 h 后对比接种与未接种病毒的细胞形态差异并拍照。

1.5 对重组分泌型碱性磷酸酶杆状病毒(AcMNPV-SEAP)敏感性检测

1.5.1 AcMNPV-SEAP 的构建方法：分泌型碱性磷酸酶(secreted alkaline phosphatase, SEAP)基因来自 Clontech Laboratories 公司的 pSEAP2-Control 质粒(货号 631717)，其序列已发布在 GenBank® 数据库(编号 U89938)。使用以下引物扩增获得 SEAP 基因：SEAP-F：5′-ATGCTGCTGCTGCTGCTGCT-3′；SEAP-R：5′-GGATCCTGTCTGCTCGAAGCGGCCGG-3′，大小为 1 590 bp，酶切位点为 *Bam*HI，酶切后为1 385 bp。

利用 Life Technologies 公司的 Bac-to-Bac® 杆状病毒表达系统构 AcMNPV-SEAP，其中转移载体使用 pFastBac HT B 质粒构建。使用 Ni-NTA Purification System 试剂盒(货号 K950-01)分离纯化获得重组 SEAP 蛋白，其理论大小为 60 kDa，通过 SDS-PAGE 电泳分析重组蛋白大小。使用 Promega 公司的 Western Blue® Stabilized Substrate for Alkaline Phosphatase 试剂盒(货号 S3841)与重组蛋白底物进行反应观察是否变色进一步验证 AcMNPV-SEAP 在 Sf9 细胞中是否表达了重组蛋白。

1.5.2 对 AcMNPV-SEAP 敏感性检测：取 50 代以上的细胞系作为检测样品。供试细胞系：本研究新建的 4 个达摩凤蝶新孵幼虫细胞系，作为对照的 Sf9 和 High Five 细胞系。利用 Reed & Münch 的有限稀释法(limiting dilution)分别测定各细胞系的半数组

织培养感染剂量(median tissue culture infectious dose, $TCID_{50}$)(Murhammer, 2007; Summers and Smith, 1987),其中供试细胞系的初始密度均控制在 1.0×10^{6}个/mL 左右,病毒储备液滴度为 3.19×10^{8} pfu/mL,分别做 10^{-4}, 10^{-5}和 10^{-6},一直到 10^{-10} 的稀释,感染 10 d 后使用 Toyobo 公司的 Reporter Assay Kit-SEAP 试剂盒(货号 SAK-101)对每孔重组 SEAP 的表达量进行检测。

1.6　数据分析

1.6.1　细胞系形态统计分析方法:使用 Olympus IX71®倒置显微镜对培养中的达摩凤蝶细胞系进行拍照。每个细胞系选取 10 个不同培养瓶拍照。使用 Adobe® Photoshop® CS6 Extended 中的"计数工具"分别对每张照片中的不同形态的细胞(分为圆形、梭形及多边形细胞)进行计数统计。使用 Microsoft® Excel® 2013 计算各细胞系不同形态细胞所占比例的平均值和标准差。

1.6.2　细胞系大小分析统计方法:使用 Olympus CellSens®图像分析软件对各细胞系中圆形细胞直径,以及梭形细胞的长轴和短轴进行测量,使用 Microsoft® Excel® 2013 计算其平均值和标准差。

1.6.3　染色体数量统计与分析方法:使用 Adobe® Photoshop® CS6 Extended 中的"计数工具"对各细胞系的染色体条数进行统计,每个细胞系统计的样本数(n)不少于 100 个细胞。使用 IBM® SPSS® Statistics Ver. 19 对各细胞系染色数量进行频数分析,并绘制直方图以及正态曲线。

1.6.4　$TCID_{50}$ 计算方法:使用 Microsoft® Excel® 2013 进行数据分析。对 96 孔板最后一行(H 行,即空白对照)12 孔的化学发光值求平均值 A 和标准差 B。利用下列公式将其他 84 孔对应的化学发光值 C 转换为阴性(－)或阳性(＋)标记:

$$|C-A|\begin{cases} > B, & + \\ \leqslant B, & -。\end{cases}$$

即 C 与 A 差值的绝对值如果大于 B 则标记该孔为阳性,表示此孔细胞受到了 AcMNPV-SEAP 的侵染;否则标记为阴性。根据标记结果使用文献所述方法(Grasela *et al.*, 2012)计算 $TCID_{50}$ 和感染复数(multiplicity of infection, MOI)。

2　结果

2.1　达摩凤蝶新孵幼虫细胞系的建立

2.1.1　原代培养:原代培养共获得 38 瓶培养物,其中有 9 瓶在培养初期有大量细胞从组织块上迁出并贴壁生长(图 1: A)。这些细胞的形态有圆形、梭形,以及多边形,细胞饱满且边缘明亮有光泽,分裂增殖旺盛。经过 1 个月的培养,有 9 瓶细胞已长满瓶底。但之后细胞分裂速度减缓直至停滞,镜检观察发现绝大多数细胞轮廓渐变模糊,胞内出现空泡及多个明亮的颗粒状内含物(图 1: B)。这段时期持续长达 2 个月。当培养工作进入 4 个月后,有 7 瓶培养物形态开始发生转变,细胞边缘变得清晰有光泽,胞内空泡结构消失,但颗粒状细胞内含物仍然很多。细胞渐渐恢复增殖能力。当观察到新增细胞已贴满培养瓶底并生长为多层细胞时进行分瓶传代培养。

2.1.2　传代培养:第 1 次传代操作时,由于细胞还未适应吹打力对其造成的损伤,出现大量细胞破碎的现象,部分游离的细胞团漂浮在培养基中无法继续贴壁生长。经过 1 个半月的培养,细胞形态和活力逐渐恢复。当镜检发现细胞生长贴满平底后进行第 2 次传代。之后又过了 1 个月进行第 3 次传代。随着细胞逐渐适应,其增殖能力更加旺盛,传代的时间间隔越来越短。经过了 2 年多的培养,最终有 4 瓶培养物传代超过 50 次且生物学特性一直良好,成为稳定的达摩凤蝶新孵幼虫细胞系,分别命名为 RIRI-PaDe-1, RIRI-PaDe-2, RIRI-PaDe-3 及 RIRI-PaDe-4。4 个细胞系在液氮中能够长期保存,复苏成功。

2.2　达摩凤蝶新孵幼虫细胞系的生物学特征

2.2.1　细胞形态:各细胞系生长至第 50 代后,我们对其细胞形态和大小进行分类和测量。RIRI-PaDe-1 的细胞类型组成有圆形、梭形,以及多边形(三边或四边,类似表皮细胞)(图 1: D),其中圆形细胞所占比例最大,约 61.73% ± 1.33 %(平均值 ± 标准差,下同),直径从 7.06 ~ 35.11 μm 不等(样本量 n = 210 个细胞);其次是梭形占 30.56% ± 3.19%,长度从 15.28 ~ 58.29 μm 不等(n = 100);多边形所占比例最少为 7.71% ± 3.01%,大小不规则。

细胞系 RIRI-PaDe-2 主要为圆形细胞(图 1: E),直径从 7.14 ~ 27.66 μm 不等(n = 170),平均直径为 13.92 ± 0.03 μm。

RIRI-PaDe-3 的细胞类型组成与上述 2 个细胞有较大差异。如图 1(C)所示,贴于培养瓶底的主要为类似表皮细胞和纤维状细胞,它们形态各异成片生长,细胞膜难于识别,胞内有大量空泡状结构。圆形细胞则附着于这些贴壁细胞之上成团生长。这些圆形细胞团中心区域的细胞密度很高,它们相互叠加形成多层结构,裸眼即可观察到这些细胞斑。研究

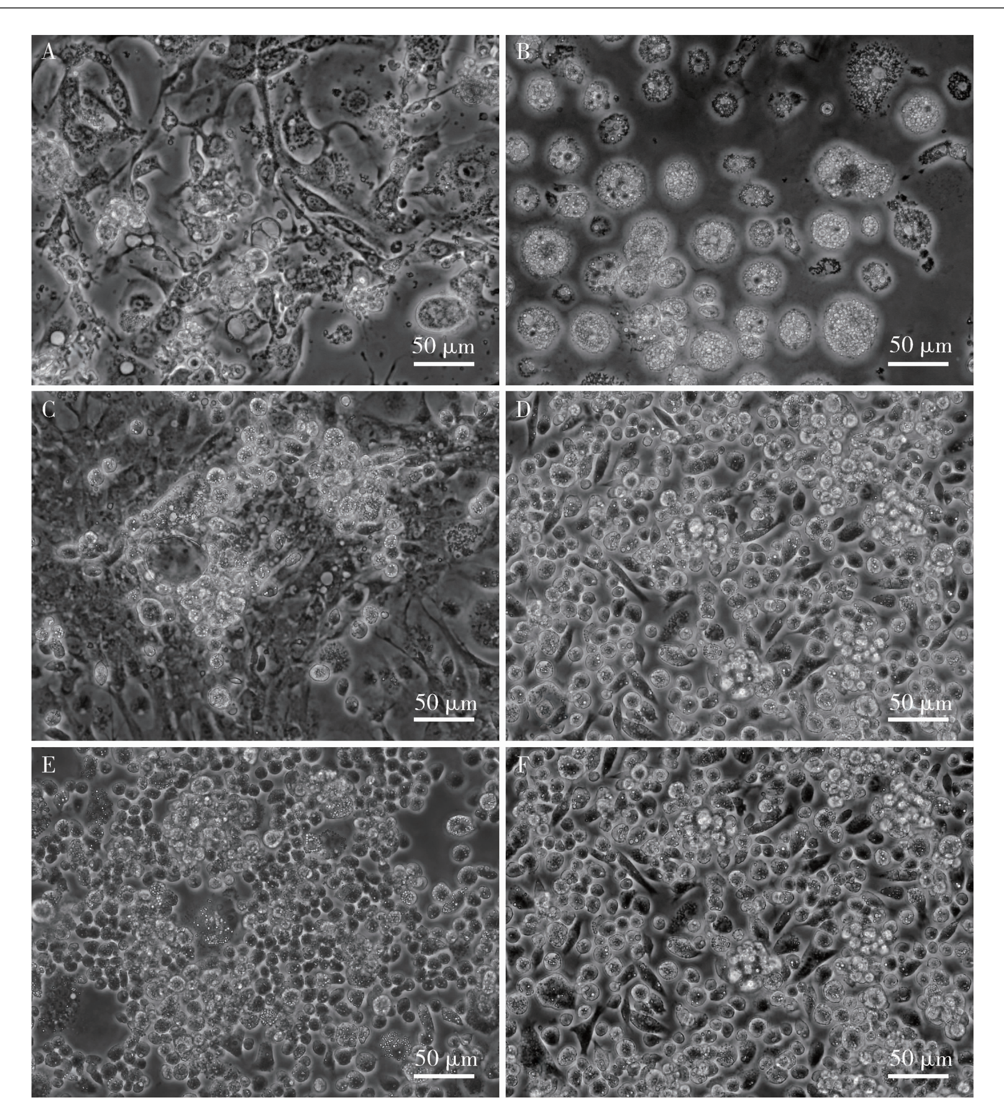


图 1 4 个达摩凤蝶新孵幼虫细胞系形态照片

Fig. 1 Photomicrographs of four cell lines developed from the neonate larvae of *Papilio demoleus*

A：原代培养 2 周后的 RIRI-PaDe-3 细胞形态 Photomicrograph of RIRI-PaDe-3 cells after 2 weeks of primary culture；B：原代培养 2 个月后的 RIRI-PaDe-3 细胞，胞内出现大量空泡状结构 Isolated round cells with intracytoplasmic vacuoles appeared after 2 months of RIRI-PaDe-3 primary culture；C：传至第 52 代的 RIRI-PaDe-3 细胞系形态照片 RIRI-PaDe-3 cell line of the 52nd passage；D：传至第 53 代 RIRI-PaDe-1 细胞系的形态照片 RIRI-PaDe-1 cell line of the 53rd passage；E：传至第 60 代的 RIRI-PaDe-2 细胞系形态照片 RIRI-PaDe-2 cell line of the 60th passage；F：传至第 52 代的 RIRI-PaDe-4 细胞系形态照片 RIRI-PaDe-4 cell line of the 52nd passage.

发现，如果长时间不更换培养基，待营养物质消耗殆尽时，细胞团中心细胞逐渐褐化并扩散，而其他 3 个细胞系未发现类似褐化现象，其原因还有待进一步研究。

RIRI-PaDe-4 细胞系类型组成和大小与 PaDe-1 非常类似（图 1：F），包括圆形、梭形以及多边形细胞。其中圆形细胞占 58.35% ±4.22%，直径平均为 13.81 ±0.42 μm（n =130）。

2.2.2 生长曲线及细胞倍增时间：图 2 所示为 4 个达摩凤蝶新孵幼虫细胞系在传至第 50 代后的生长曲线。根据曲线计算各细胞系的倍增时间见表 2。由结果看出 RIRI-PaDe-3 细胞系的群体倍增时间最长，其余 3 个细胞系的倍增时间比较接近。

2.2.3 核型分析：在 1 000 倍光学显微镜下观察发现，4 个达摩凤蝶新孵幼虫细胞系的染色体呈点状聚集于核区，且数量众多（图 3），无法通过染色体形态进行辨认，只能进行数量统计分析。各细胞系染色体条数分布统计结果见图 4。从图表可以看出，4 个细胞系染色体数量均呈正态分布，统计的细胞数量越多（如 RIRI-PaDe-2 的样本量 n =176），这种分布趋势越明显。其中，细胞系 RIRI-PaDe-2，RIRI-PaDe-3 及 RIRI-PaDe-4 的染色体数目分布区间比较接近，主要分布在 45 ~97 条之间，细胞系 RIRI-PaDe-1 的染色体条数相比偏少，主要集中在 36 ~90 条之间。各细胞系染色体平均条数见表 2。

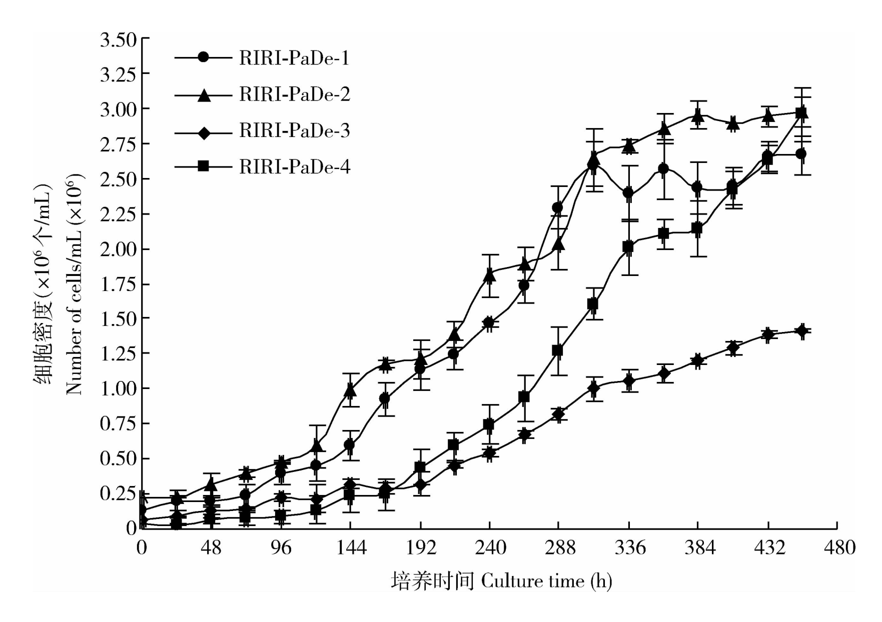


图 2　4 个达摩凤蝶新孵幼虫细胞系生长曲线

Fig. 2　Growth curves of four cell lines developed from the neonate larvae of *Papilio demoleus*

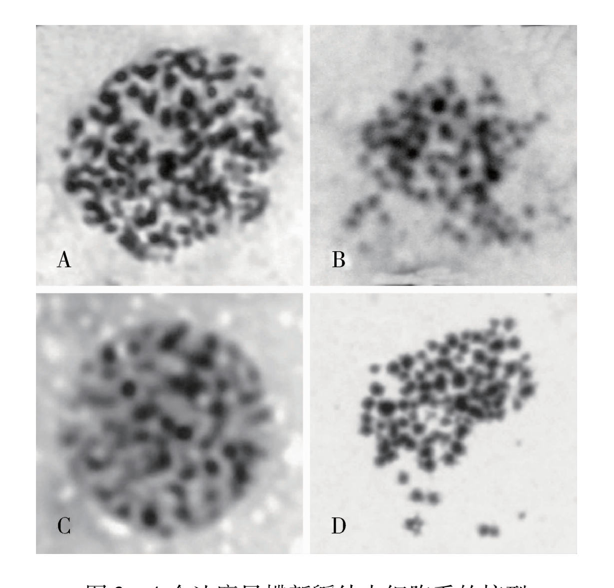


图 3　4 个达摩凤蝶新孵幼虫细胞系的核型

Fig. 3　Representative mitotic chromosomal spread of four cell lines developed from the neonate larvae of *Papilio demoleus*

A－D：分别为细胞系 RIRI-PaDe-1，RIRI-PaDe-2，RIRI-PaDe-3 以及 RIRI-PaDe-4 的染色体形态照片 Chromosomal spreads of RIRI-PaDe-1, RIRI-PaDe-2, RIRI-PaDe-3, and RIRI-PaDe-4, respectively.

2.2.4　细胞系来源分子鉴定：使用 PCR 扩增达摩凤蝶幼虫组织块、4 个达摩凤蝶新孵幼虫细胞系，以及作为对照的 High Five 细胞系的 COI 基因序列（GenBank 登录号 KP200877 ~ KP200882），并对获得的结果进行碱基比对，结果为来源于 4 个细胞系和幼虫组织的 COI 序列一致性为 100%，与 High Five 细胞系的 COI 序列一致性为 87%，证明 4 个细胞系来源于达摩凤蝶组织。

2.3　4 个达摩凤蝶新孵幼虫细胞系对 AcMNPV 的敏感性

4 个达摩凤蝶新孵幼虫细胞系感染 AcMNPV 病毒 120 h 后的形态见图 5。RIRI-PaDe-1 和 RIRI-PaDe-3 细胞大量破碎（图 5：A 和 C），细胞表面有明显突起，胞内出现空腔。与未感染病毒的对照相比，RIRI-PaDe-2 和 RIRI-PaDe-4 细胞内颗粒状内含物均明显增多，RIRI-PaDe-2 有部分细胞破碎，但 RIRI-PaDe-4 破碎的细胞较少。可见，4 个达摩凤蝶新孵幼虫细胞系对 AcMNPV 均表现出敏感性，但敏感性强弱有明显不同。

2.4　4 个达摩凤蝶新孵幼虫细胞系对 AcMNPV-SEAP 的敏感性

为了定量研究 4 个达摩凤蝶新孵幼虫细胞系对 AcMNPV 敏感性差异，本研究构建了重组分泌型碱性磷酸酶杆状病毒（AcMNPV-SEAP），通过测定重组蛋白表达量，结合有限稀释法测定各细胞系的半数组织培养感染剂量 $TCID_{50}$，比较各细胞系对病毒的敏感性。

2.4.1　AcMNPV-SEAP 的构建：使用 P2 代 AcMNPV-SEAP 感染 Sf9 细胞系 96 h 后收集细胞液，通过分离纯化获得重组 SEAP 蛋白，SDS-PAGE 电泳检测结果见图 6。SEAP 的理论大小为 57.7 kDa，加上 N 端多聚组氨酸（6 × His）标签和 TEV 识别位点，产物大小在 60 kDa 左右。从电泳结果可见，洗脱后的蛋白大小接近预测值。利用 5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸（BCIP）作为底物与洗脱样品一起膜

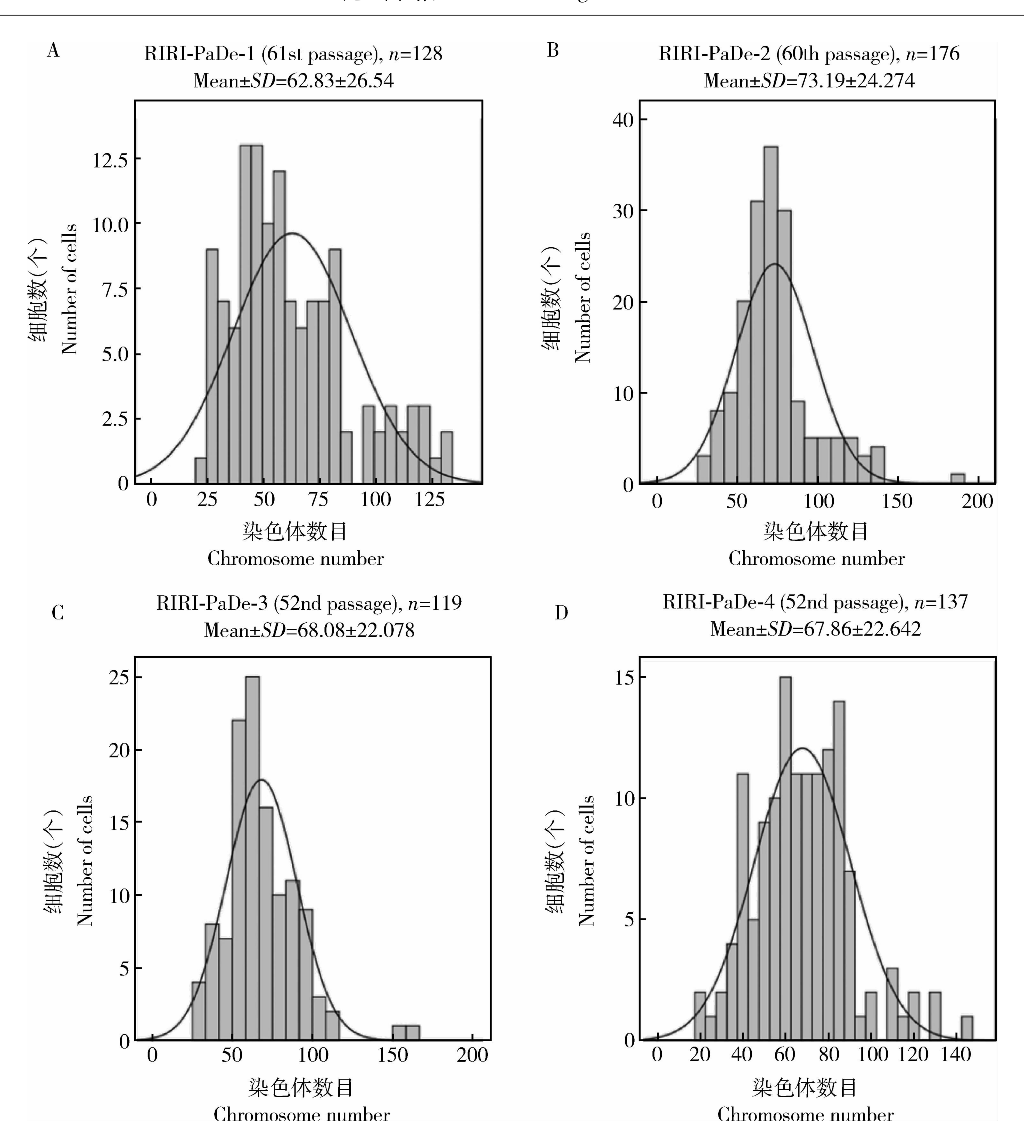


图 4　4 个达摩凤蝶新孵幼虫细胞系染色体数目分布

Fig. 4　Chromosome number distribution in four cell lines developed from the neonate larvae of *Papilio demoleus*

n：统计的细胞数 Sample size.

上孵育可显的深紫色，证明样品中含有碱性磷酸酶。由此可见，构建的 AcMNPV-SEAP 在 Sf9 细胞系中表达了重组 SEAP。使用蚀斑检测法（plaque assay）测定 P2 代 AcMNPV-SEAP 的滴度为 3.19×10^8 pfu/mL，并以此为供试病毒储备液进行细胞对 AcMNPV-SEAP 敏感性研究。

2.4.2　对 AcMNPV-SEAP 的敏感性：表 1 列出了使用 SEAP 化学发光法检测获得的 Sf9 细胞系受到不同稀释度 AcMNPV-SEAP 感染后重组 SEAP 表达量数据，其行列数值对应试验中 96 孔板中每孔读数。表中最后一行数据对应未受病毒感染的细胞对照样，其平均值为 36 185.53，标准差为 71 949.75，计算其他孔数值与此平均值的差值并取绝对值，如果结果大于标准差，则认为此孔细胞受到 AcMNPV-SEAP 侵染，标记为“＋”，否则标记为“－”（表 1）。再根据 Reed 和 Münch 的计算方法获得 Sf9 的 $TCID_{50}$ 数值为 $10^{-6.54}$，其含义是将供试的 AcMNPV 病毒液做 $10^{-6.54}$ 倍的稀释后接种到 96 孔细胞培养板，每孔 100 μL 病毒稀释液，可使 50% 接种孔（即 48 孔）的细胞发生病变。换算病毒滴度（用 MOI 表示）为 2.39×10^8 pfu/mL。同样计算方法获得 4 个达摩凤蝶细胞系 $TCID_{50}$ 和 MOI 值（表 2）。AcMNPV-SEAP 能够侵染大部分孔中的 High Five 细胞，结果已超出 $TCID_{50}$ 的计算范围，在供试的 6 个细胞系中，High Five 对 AcMNPV-SEAP 最敏感。

根据结果可知，6 个细胞系对 AcMNPV-SEAP 的敏感性由大到小分别为：High Five，RIRI-PaDe-3，RIRI-PaDe-4，RIRI-PaDe-1，Sf9 和 RIRI-PaDe-2。在

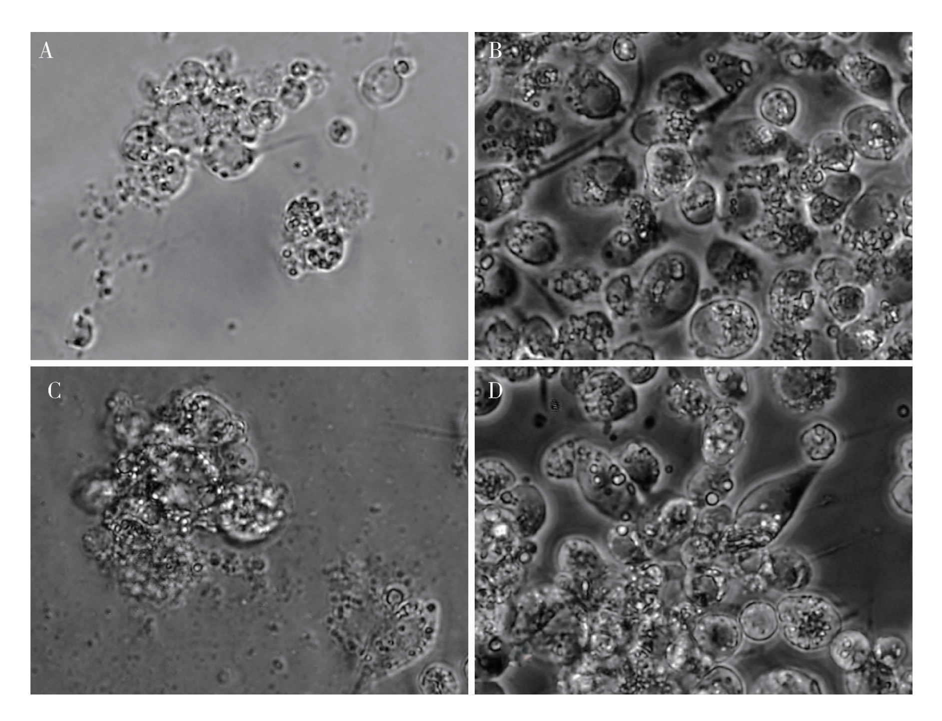


图 5　感染 AcMNPV 病毒的 4 个达摩凤蝶新孵幼虫细胞系形态照片

Fig. 5　Photomicrograph of four cell lines developed from the neonate larvae of *Papilio demoleus* infected with AcMNPV

A－D：分别为细胞系 RIRI-PaDe-1，RIRI-PaDe-2，RIRI-PaDe-3 以及 RIRI-PaDe-4 受 AcMNPV 侵染后的形态照片 Photomicrograph of RIRI-PaDe-1，RIRI-PaDe-2，RIRI-PaDe-3，and RIRI-PaDe-4 infected with AcMNPV，respectively.

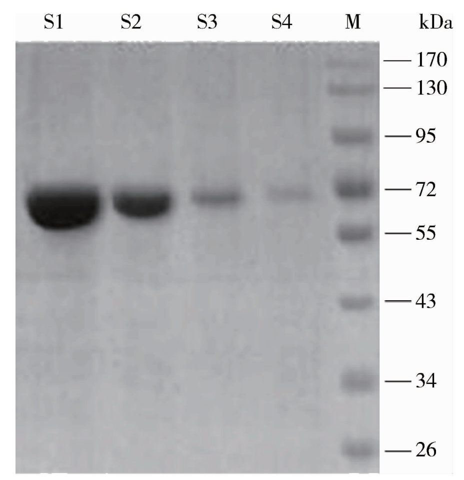


图 6　重组分泌型碱性磷酸酶 SDS-PAGE 电泳结果

Fig. 6　SDS-PAGE analysis of the recombinant secreted alkaline phosphatase

S1－S4：不同洗脱时间收集的样品 Samples obtained at different elution time；M：蛋白质分子量标准物 Protein molecular weight marker.

4 个达摩凤蝶细胞系当中，RIRI-PaDe-3 对 AcMNPV-SEAP 较为敏感，可作为重组杆状病毒表达的宿主。

3　讨论

综上所述，本文以达摩凤蝶新孵幼虫为试验材料建立了 4 个达摩凤蝶细胞系，其基础生物学特性、病毒敏感性等方面均有差异。4 个达摩凤蝶细胞系的建立不仅可用于昆虫生理生化及基础生物学的研究，也为野生幼虫的生物防治和人工繁殖时减少病害提供试验材料。

从结果看出，本研究建立的 4 个细胞系都来源于达摩凤蝶新孵幼虫，从细胞来源的分子鉴定也证明其遗传背景相同，但各系的生物学特性却有很大差异。昆虫细胞建系过程也是一个细胞筛选的过程。本研究使用新孵幼虫全虫作为试验材料，原代培养物中包含有不同组织来源的各种类型的细胞。其中有些类型细胞生长增殖速率更快，最终成为构成细胞系的主要细胞类群；而增殖较慢的一类细胞群体会在多次传代后渐渐被淘汰。4 个新建细胞系均表现这样的特点，且由于各细胞系的主要细胞类型不同，因此造成了各系之间生物学特性的差异。通过细胞的克隆技术从细胞群体中筛选出具有某一特性的单一来源细胞系成为了下一步的研究内容。

昆虫细胞系来源鉴定的方法有很多种，早期主要使用同工酶法对细胞代谢过程中的关键酶进行检测获得其电泳图谱，通过比对同工酶图谱区分细胞来源。此方法操作流程较复杂，对操作人员技巧有一定要求（Brown and Knudson，1982）。随着 DNA 测序技术越来越成熟，费用越来越低，通过比对不同

表 1 化学发光法检测 Sf9 细胞系对 AcMNPV-SEAP 的敏感性

Table 1 Analysis of the sensitivity of Sf9 cell line to AcMNPV-SEAP using chemoluminescence

病毒稀释度 Virus dilution	化学发光值 Chemiluminescence value											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
10^{-4}	451 127.00 (+)	662 403.00 (+)	497 276.00 (+)	628 223.00 (+)	708 099.00 (+)	554 303.00 (+)	645 345.00 (+)	786 192.00 (+)	653 679.00 (+)	315 029.00 (+)	696 792.00 (+)	782 000.00 (+)
10^{-5}	360 077.00 (+)	202 603.00 (+)	276 348.00 (+)	261 265.00 (+)	335 469.00 (+)	309 886.00 (+)	179 680.00 (+)	255 857.00 (+)	227 923.00 (+)	141 544.00 (+)	242 033.00 (+)	291 646.00 (+)
10^{-6}	37 896.60 (−)	9 578.55 (−)	52 836.00 (−)	10 093.50 (−)	130 150.00 (+)	132 045.00 (+)	249 058.00 (+)	89 857.60 (−)	38 342.20 (−)	18 212.90 (−)	46 283.10 (−)	64 288.90 (−)
10^{-7}	124 662.00 (+)	13 572.70 (−)	5 273.85 (−)	4 620.12 (−)	271 111.00 (+)	328 282.00 (+)	145 795.0 (+)	32 427.70 (−)	56 442.30 (−)	36 664.70 (−)	124 247.00 (+)	25 061.00 (−)
10^{-8}	2 571.81 (−)	49 199.30 (−)	4 492.32 (−)	14 250.50 (−)	5 509.17 (−)	6 428.32 (−)	161 731.00 (+)	179 411.00 (+)	17 234.50 (−)	6 536.37 (−)	7 299.91 (−)	4 684.75 (−)
10^{-9}	241 691.00 (+)	32 873.30 (−)	7 766.36 (−)	9 099.54 (−)	3 725.19 (−)	8 114.51 (−)	5 157.81 (−)	5 138.29 (−)	221 014.00 (+)	140 604.00 (+)	29 346.20 (−)	203 131.00 (+)
10^{-10}	10 318.40 (−)	3 631.33 (−)	61 663.30 (−)	3 847.45 (−)	1 307.78 (−)	5 093.04 (−)	2 115.30 (−)	2 260.22 (−)	3 994.70 (−)	1 696.19 (−)	3 826.04 (−)	4 460.60 (−)
对照 Control *	257 520.00	26 967.80	9 016.16	26 719.20	3 563.45	12 286.40	2 985.65	6 430.74	2 782.94	1 182.52	20 003.20	64 768.30

* 未接种病毒的阴性对照 Uninfected cells as the negative control. +：此孔细胞受到 AcMNPV-SEAP 侵染 Infected with AcMNPV-SEAP；−：此孔细胞未受到 AcMNPV-SEAP 侵染 Uninfected with AcMNPV-SEAP.

表 2 4 个达摩凤蝶新孵幼虫细胞系主要生物学特性比较

Table 2 Comparison of main biological characteristics of four cell lines developed from the neonate larvae of *Papilio demoleus*

细胞系 Cell line	细胞群体倍增时间(h) Population doubling time	平均染色体数目 Chromosome number (平均值 Mean ± *SD*)	对 AcMNPV-SEAP 敏感性 Sensitivity to AcMNPV-SEAP	
			$TCID_{50}$	MOI (pfu/mL)
RIRI-PaDe-1	69.77	62.83 ± 26.54	$10^{-7.50}$	2.18×10^{9}
RIRI-PaDe-2	67.42	72.19 ± 24.27	$10^{-5.57}$	2.54×10^{7}
RIRI-PaDe-3	81.48	68.08 ± 22.09	$10^{-9.22}$	1.15×10^{11}
RIRI-PaDe-4	65.43	67.86 ± 22.64	$10^{-7.78}$	4.11×10^{9}

AcMNPV-SEAP 稀释前的储备液滴度为 3.19×10^{8} pfu/mL。The titer of AcMNPV-SEAP stock solution was 3.19×10^{8} pfu/mL before being diluted.

同物种特异性的碱基序列进行物种分类已变得十分普及。在序列选择上,COI 被认为是具有足够变异性可区分不同物种的小分子基因序列,目前作为标准比对序列应用于 DNA 条形码技术(DNA barcoding),具有操作简便、可信度高等优点,开始被广泛应用在分子水平上对不同来源物种进行区分(Hebert *et al.*, 2013)。本研究使用 DNA 条形码技术对达摩凤蝶细胞系来源进行鉴定。引物的设计是通过分析来自无脊椎动物门的 11 个纲的大量 COI 基因片段样本而获得的"通用"引物(Folmer *et al.*, 1994)。对 20 个虫种来源的组织和细胞进行分析的结果显示,此方法可用于昆虫细胞系来源鉴定,其准确度很高。

从图 1 细胞形态照片可以看出,在生长状态良好的情况下,4 个达摩凤蝶细胞中均有明亮的颗粒物。有关这些颗粒物来源及组成目前还尚未知晓,有待进一步研究确定。但这样的细胞结构特点在研究杆状病毒侵染时会造成一定干扰。当细胞受到 AcMNPV 侵染后会在细胞内形成病毒颗粒,通过镜检可区分这些受感染的细胞。而达摩凤蝶细胞中含有的颗粒物会干扰判断造成统计上的误差,导致结果不准确。为了避免这种主观因素造成的误差,本研究使用重组杆状病毒 AcMNPV-SEAP 作为研究细胞对病毒敏感性的工具,通过检测重组 SEAP 在达摩凤蝶细胞中的表达量来确定细胞受感染情况,可避免上述原因造成的误差,提高数据的可靠性。

从对病毒敏感性研究结果看出,虽然 4 个细胞系都来源于达摩凤蝶,但它们对 AcMNPV-SEAP 的敏感性有显著差异。研究已证明,AcMNPV 基因组中存在可识别宿主细胞的许多相关基因(Ishikawa *et al.*, 2004),它们的表达对病毒的宿主域影响非常大。如宿主细胞特异性因子 1(host cell specific factor, HCF-1),它能使 AcMNPV 识别特异性的组织和细胞(Wilson *et al.*, 2005)。虽然已确定有多个基因参与 AcMNPV 宿主域的识别,但有关杆状病毒宿

主域决定的分子机制仍未有重大突破。弄清这一机制,可对病毒基因进行改变以扩大杆状病毒的宿主域,对发挥杆状病毒在生产实践中的潜能具有重要意义。本研究建立的 4 个细胞系遗传背景相同,但对病毒敏感性的反应机制不同,是研究杆状病毒与昆虫细胞之间相互关系的理想材料。

参考文献（References）

Brown SE, Knudson DL, 1982. Characterization of invertebrate cell lines. *In Vitro*, 18(4): 347–350.

Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R, 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 3(5): 294–299.

Granados RR, Li GX, Blissard GW, 2007. Insect cell culture and biotechnology. *Virol. Sin.*, 22(2): 83–93.

Granados RR, Li GX, Derksen ACG, McKenna KA, 1994. A new insect cell line from *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4) susceptible to *Trichoplusia ni* single enveloped nuclear polyhedrosis virus. *J. Invertebr. Pathol.*, 64(3): 260–266.

Grasela JJ, McIntosh AH, Ringbauer JJ, Goodman CL, Carpenter JE, Popham HJR, 2012. Development of cell lines from the cactophagous insect: *Cactoblastis cactorum* (Lepidoptera: Pyralidae) and their susceptibility to three baculoviruses. *In Vitro Cell. Dev. Biol. –Animal*, 48(5): 293–300.

Hebert PDN, Ratnasingham S, de Waard JR, 2003. Barcoding animal life: cytochrome *c* oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. Biol. Sci.*, 270(Suppl. 1): 96–99.

Ishikawa H, Ikeda M, Alves CAF, Thiem SM, Kobayashi M, 2004. Host range factor 1 from *Lymantria dispar* nucleopolyhedrovirus (NPV) is an essential viral factor required for productive infection of NPVs in IPLB-Ld652Y cells derived from *L. dispar*. *J. Virol.*, 78(22): 12703–12708.

Lewis DS, 2009. Lime swallowtail, chequered swallowtail, citrus swallowtail *Papilio demoleus* Linnaeus (Insecta: Lipidoptera: Papilionidae). Available online at: http://edis. ifas. ufl. edu/pdffiles/IN/IN78600. pdf

Lynn DE, 2002. Methods for maintaining insect cell cultures. *J. Insect Sci.*, 2(1): 9–15.

Mitsuhashi J, 2001. Development of highly nutritive culture media. *In Vitro Cell. Dev. Biol. –Animal*, 37(6): 330–337.

Mitsuhashi J, 2002. Invertebrate Tissue Culture methods. Springer-Verlag, Tokyo. 307–400.

Murhammer DW, 2007. Baculovirus and Insect Cell Expression Protocols 2nd ed. Humana Press Inc., New Jersey. 460 pp.

Schneider I, 1972. Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 27(2): 353–365.

Summers MD, Smith GE, 1987. A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedure. Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555. 1–56.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S, 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.*, 24(8): 1596–1599.

Vaughn JL, Goodwin RH, Tompkins GJ, McCawley P, 1977. The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *In Vitro*, 13(4): 213–220.

Wilson JA, Forney SD, Ricci AM, Allen EG, Hefferon KL, Miller LK, 2005. Expression and mutational analysis of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus HCF-1: functional requirements for cysteine residues. *J. Virol.*, 79(22): 13900–13914.

Yeh SC, Lee ST, Wu CY, Wang CH, 2007. A cell line (NTU-MV) established from *Maruca vitrata* (Lepidoptera: Pyralidae): characterization, viral susceptibility, and polyhedra production. *J. Invertebr. Pathol.*, 96(2): 138–146.

Zhang X, Feng Y, Ding WF, Chen XM, Wang CY, Ma T, 2011. Establishment and characterization of an embryonic cell line from *Gampsocleis gratiosa* (Orthoptera: Tettigoniidae). *In Vitro Cell. Dev. Biol. –Animal*, 47(4): 327–332.

Zhang X, Feng Y, Ding WF, Chen XM, Wang CY, Ma T, 2012. Characterization of a new insect cell line that is derived from the neonate larvae of *Papilio xuthus* (Lepidoptera: Papilionidae) and its susceptibility to AcNPV. *Tissue Cell*, 44(3): 137–142.

Zheng GL, Li CY, Zhou HX, Li SW, Li GX, Xue M, 2010. Establishment of two new cell lines from the embryonic tissue of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and their responses to baculovirus infection. *Acta Entomologica Sinica*, 53(2): 167–174. [郑桂玲, 李长友, 周洪旭, 李淑文, 李国勋, 薛明, 2010. 两株棉铃虫胚胎新细胞系的建立及其对杆状病毒侵染的反应. 昆虫学报, 53(2): 167–174]

（责任编辑：赵利辉）